

이중중합효소연쇄반응에 의한 변 검체에서의 *Clostridium difficile* B 독소 유전자 직접 검출

박희경, 이영미, 장현정, 김철민*, 이경원**, 정석훈***, 박무인****

(주)에스제이하이테크 생명의학 연구소; 부산대학교 의과대학 생화학교실*;
연세대학교 의과대학 진단검사의학교실**, 세균내성연구소***;
고신대학교 의과대학 진단검사의학교실****, 내과학교실*****

Direct Detection of *Clostridium difficile* Toxin B Gene by Nested PCR in Human Stool Specimens

Hee Kyung Park, Young Mi Lee, Hyun Jung Jang, Cheol Min Kim,
Kyungwon Lee, Seok Hoon Jeong, Moojin Park

Institute for Biomedical Research, SJ Hightech Co.; Department of Biochemistry, Pusan National University College of Medicine, Busan; Department of Diagnostic Medicine** and Research Institute of Bacterial Resistance***, Yonsei University College of Medicine, Seoul; Department of Diagnostic Medicine**** and Internal Medicine*****, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea*

Background: *Clostridium difficile* is the major cause of antibiotic-associated diarrhea (AAD) and pseudomembranous colitis (PMC). The aim of this study was to develop the nested PCR assay for direct detection of toxigenic *C. difficile* in stool specimens and to evaluate the usefulness of the method.

Methods: Specificity of newly designed primers are tested with 36 reference strains of intestinal flora. Lower detection limit of nested PCR for B toxin gene in *C. difficile* was determined using 10-fold serial dilutions of *C. difficile* ATCC 9689. One hundred and two clinical stool samples were cultured for detection of *C. difficile* on cycloserine-cefoxitin- fructose agar and the PCR assay for detection of toxin B gene in *C. difficile* isolates was performed. Nested PCR assay for direct detection of toxin B gene in clinical samples was also performed.

Results: Nested PCR assay showed negative amplification results in intestinal floras except *C. difficile* ATCC 9689. Lower detection limit of nested PCR for toxin B gene was 10^4 CFU/mL. Sensitivity of nested PCR assay compared to culture method was 100% (29/29), and the specificity was 68% (50/73).

Conclusion: Nested PCR assay showed high sensitivity in direct detection of toxin B gene in *C. difficile* isolates even after administration of metronidazole, so the assay could be used in initial diagnosis and follow-up tests of AAD and PMC. (Korean J Clin Microbiol 2003;6(1):63-68)

Key words : *Clostridium difficile*, nested PCR, Toxin B

서 론

*Clostridium difficile*은 혐기성 아포형성 그람양성 간균으로 A 독소(enterotoxin)와 B 독소(cytotoxin)를 생성하여 위막성 대장염이나 항생제 연관 설사증을 일으킨다[1]. 독소를 생성하지 않는 *C. difficile*은 임상증상을 유발하지 않으며, B 독소만을 생성하고 A 독소는 생성하지 않는

접수번호: CM 6-1-02

교신저자: 정석훈

(602-702) 부산광역시 서구 암남동 34번지

고신의료원 진단검사의학과

TEL: 051)990-6373 FAX: 051)990-3034

E-mail: kscpjsh@ns.kosinmed.or.kr

* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원 (02-PJ1-PG11-VN01-SV02-0017)에 의하여 이루어진 것임.

Table 1. Detection for toxin B gene by nested PCR in various species

Species	Toxin B PCR Result
<i>Clostridium difficile</i> ATCC 9689	+
<i>Aeromonas hydrophilia</i> ATCC 7966	-
<i>Branhamella catarrhalis</i> ATCC 8193	-
<i>Burkholderia cepacia</i> clinical isolate	-
<i>Candida glabrata</i> clinical isolate	-
<i>Candida tropicalis</i> clinical isolate	-
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 33128	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13037	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 23499	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 15380	-
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 8043	-
<i>Enterobacter faecalis</i> ATCC 19433	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i> ATCC 14029	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	-
<i>Providencia rettgeri</i> ATCC 29914	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	-
<i>Rhanella aquatilis</i> ATCC 33071	-
<i>Shewanella putrefaciens</i> clinical isolate	-
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	-
<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 35037	-
<i>Streptococcus bovis</i> ATCC 33317	-
<i>Streptococcus intermedius</i> ATCC 27335	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 33400	-
<i>Streptococcus equisimilis</i> ATCC 9542	-
<i>Streptococcus mitis</i> clinical isolate	-
<i>Streptococcus intermedius</i> clinical isolate	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> clinical isolate	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-
<i>Salmonella typhi</i> clinical isolate	-
<i>Salmonella paratyphi A</i> clinical isolate	-
<i>Vibrio parahemolyticus</i> ATCC 17802	-

Abbreviations: +, positive result of PCR amplification; -, negative result of PCR amplification.

균주도 임상증상을 일으킨다는 보고가 있었다[2]. 임상적 증상은 무증상 혹은 가벼운 설사증에서 독성 거대결장증(toxic megacolon)까지 다양하고, 심한 경우에는 장천공이나 사망에 이를 수도 있다[3]. 임상에서 발생하는 항생제 연관 설사증의 15-20%와 위막성 대장염의 대부분은 *C. difficile*에 의해 유발된다[4,5]. Clindamycin, ampicillin, cephalosporin 등 항생제를 사용하는 환자에게서 *C. difficile*에 의한 감염증이 흔히 발생하는데, 최근에

는 면역억제 환자와 고령환자의 증가 등으로 인하여 그 발생 빈도는 점차 증가하고 있다[6]. 미국에서는 매년 300,000-3,000,000명이 *C. difficile*에 의해 감염되고, 그 치료를 위해 한 사람 당 \$6,000~\$10,000의 추가 비용이 소요된다고 한다[7]. 한국에서는 *C. difficile*의 배양 양성율이 1989년에 6%이었으나 1997년에는 29%로 배양 양성율이 현저히 증가하고 있는 추세이다[8].

*C. difficile*에 의한 감염증은 항균제 투여 중지 혹은 경구용 vancomycin이나 metronidazole의 투여로 치료가 가능하다. 그러나 임상증상만으로는 *C. difficile*과 다른 원인에 의한 장염을 감별하기가 어려우므로, 변 검체에서의 독소생성 *C. difficile* 검출이 매우 중요하다. 조직배양에 의한 세포독소검출법(cytotoxicity assay)은 독소생성 *C. difficile* 검출의 표준방법으로 간주되고 있지만, 검사에 소요되는 시간이 길고 임상검사실에서 통상적으로 시행하기에 기술적으로 어려운 단점이 있다. 이에 cycloserine-cefoxitin-fructose agar (CCFA)를 선택배지로 사용하여 *C. difficile*을 배양 후 세포독소 중화법으로 *C. difficile*을 검출하는 독소생성 배양법(toxigenic culture)이 사용되고 있는데, 이 방법은 세포독소검출법보다 민감도가 더 높고 유사한 특이도를 보이지만 검사에 3-4일이 소요되고 숙련된 기술을 필요로 하는 단점을 지니고 있다[9]. 최근에는 면역효소법(immunoassay)으로 A 독소나 B 독소를 변 검체에서 직접 검출하는 방법이 개발되었다. 이 방법은 간편하고 시간이 적게 소요되는 장점이 있지만, 민감도가 보고에 따라서 34-100%로 낮으며, 실온에서 매우 불안정한 *C. difficile* 독소의 검출을 위해서 검체 채취 즉시 검사를 시행하여야 하는 단점이 있다[10]. 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 *C. difficile* 독소 유전자의 직접검출법은 신속하고 민감도가 높은 장점이 있지만[11, 12], 변에 heme, bilirubin, urobilinogen, bile salt 등 DNA의 증폭을 억제하는 물질이 다량 존재하기 때문에 이들 억제물질을 효율적으로 제거해야 하는 문제가 있다[13]. 본 연구에서는 이중중합효소연쇄반응법(nested PCR)으로 *C. difficile*의 B 독소 유전자를 변 검체로부터 직접 검출하는 방법을 고안하고 그 유용성을 평가함으로써 *C. difficile*에 의한 항생제 연관 설사증과 위막성 대장염의 신속하고 정확한 진단과 치료에 도움을 주고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 검체

Nested PCR에 의한 *C. difficile* B 독소 검출법의 최소검출농도 측정을 위해 *C. difficile* ATCC 9689를 사용하였으며, 특이도 시험에 사용한 균주는 Table 1과 같다. 기존 방법과의 비교에는 2001년 11월부터 2002년 6월에 독소생성 *C. difficile* 검출이 의뢰된 세브란스병원 환자의 변 검

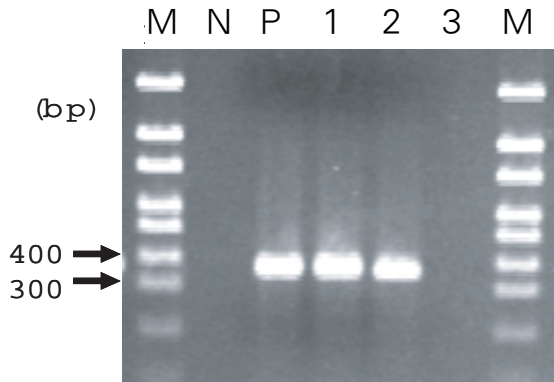


Fig. 1. Amplification patterns corresponding to the toxigenic *C. difficile* PCR assay. M, 100 bp DNA marker (Bio Basic Co., LTD. Seoul, Korea); P, toxin B positive control, reference strain (ATCC 9689); lanes 1 and 2, toxin B positive specimens; lane 3, negative specimen.

체를 사용하였다.

2. *C. difficile* 배양 및 PCR에 의한 B 독소 유전자 검출

이 등[8]의 방법에 따랐다. 즉, *C. difficile*의 정량배양을 위해서 연변 혹은 수양변 0.1 mL를 thioglycollate 배지로 10배수 단계희석하여 3개의 희석액을 만들고, 미리 환원 시킨 CCFA에 각 희석액 0.1 mL를 접종하였다. 35℃로 48 시간 혐기성 배양 후 *C. difficile*로 의심되는 집락이 증식 되면 전통적인 생화학적 방법과 ATB 32A Kit (bio-Merieux, Marcy l' Etoile, France)로 동정하였다. 증식된 *C. difficile* 균주에서의 B 독소 유전자 검출은 Gumerlock 등 [14]의 방법에 따랐다.

3. DNA 추출

Wang 등[15]의 방법으로 시행하였다. 즉, 변 검체 0.05-0.1g을 멸균된 phosphate-buffered saline (PBS, 0.05M, pH 7.4) 1 mL에 부유시켰다. 200×g로 5분간 원심분리 후 상층액을 취하는 과정을 2회 반복하였다. 9,000×g에서 10 분간 원심 후 침사를 취하여 PBS 1 mL에 부유시키는 과정을 3회 반복하였다. 침사에 동량의 InstaGene matrix (Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA)를 첨가하여 56℃에서 30분간 반응시키고 10초 동안 강하게 혼합 한 후, 100℃에서 8분간 열처리하였다. 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 얻은 상청액을 DNA 추출물로 사용하였다.

3. 시발체 고안

민감도의 극대화를 위해서 nested PCR법을 채용하였

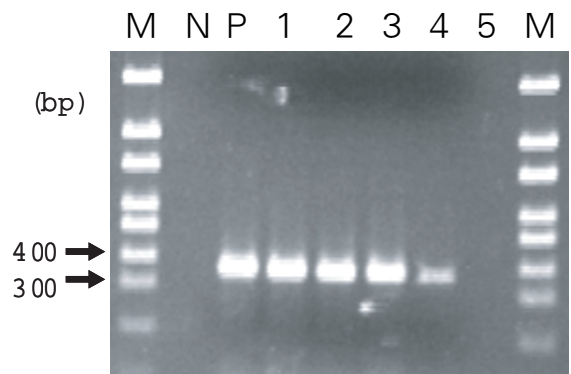


Fig. 2. Sensitivity of *C. difficile* PCR assay in detecting toxigenic *C. difficile* DNA contained in 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 and 10^7 CFU/ml. M, 100 bp DNA marker (Bio Basic Co., LTD. Seoul, Korea); P, toxin B positive control, reference strain (ATCC 9689); lane 1, 2, 3 and 4, toxin B positive; lanes 5, negative.

으며, 이를 위해서 1차 PCR용 시발체로는 6880F와 7327R, 2차 PCR용 시발체로는 6880F와 7221R을 고안하였다 (Table 2). *C. difficile* B 독소의 염기서열은 GenBank (accession No. X92982)에서 취하였다. DNASpace version 3.02 (Genetic Systems, Hitachi, Japan)와 Vector NTI Suite (InforMax, Frederick, MD, USA)을 사용한 multialignment 분석 결과에 기초하여 *C. difficile* B 독소 유전자의 특이적인 부분을 시발체로 고안하였다. 고안된 시발체와 *C. difficile* 독소 유전자 부위의 염기서열 동정은 BLAST로 분석하였다 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4. Nested PCR

PCR 반응 혼합물은 DNA 5 μ L, 1× 완충액 (500 mM KCl, 100 mM HCl; pH 9.0, 1% triton X-100) 2.5 μ L, dNTP 각 100 μ M, 1.5 mM MgCl₂, 0.02% BSA, 0.05% Glycerol, 1 U Taq DNA polymerase (Qiagen Inc., CA, USA) 및 10 pM 시발체로 조제하였다. 1차 PCR은 95℃에서 3분간 열처리 후, 95℃에서 20초, 57℃에서 1분, 72℃에서 30초씩 25 회 반응시키고, 72℃에서 10분간 연장하였다. 1차 PCR 산물을 주형 DNA로 사용하여 2차 PCR 반응 혼합물에 넣고 1차와 같은 조건에서 30회 반응시켰다. 반응액 7 μ L를 0.5 μ g/mL의 ethidium bromide가 함유된 2% agarose gel에 전기영동한 후 340 bp의 산물을 확인하였다 (Fig. 1).

5. *C. difficile* B 독소 유전자 검출 특이성 및 최저 검출농도 시험

특이성 시험을 위해서 Table 2의 각 균주를 각각 10^7 CFU/mL로 희석 후 상기 방법과 같이 nested PCR을 시행

Table 2. Sequences of the PCR primers

Target gene	Primer	Sequence (5' - 3')	Position *
<i>tcdB</i>	1st	6880F 5' - agactggatggatatatgat - 3'	10478 - 10497
		7327R 5' - cactaattgagctgtatcag - 3'	10925 - 10944
	2nd	6880F 5' - agactggatggatatatgat - 3'	10478 - 10497
		7221R 5' - aaatctaaccaaccagtatag - 3'	10818 - 10838

* Hundsberger et al. (GenBank accession number X92982).

Table 3. Results of nested PCR assay for toxin B gene of *C. difficile* and culture

Culture		Direct detection for toxin B gene in stool specimens by nested PCR		No. of Cases
Culture	Culture based PCR *			
+	+	+		29
+	-	-		2
-	ND	+		23
-	ND	-		48

* Results for the detection of toxin B gene in *C. difficile* isolates.

Abbreviations: + , positive result of PCR amplification; - , negative result of PCR amplification; ND, not done.

하였다. 최저검출농도 시험은 순수 배양된 *C. difficile* ATCC 9689를 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 및 10^3 CFU/mL로 희석 후, 각각의 희석액으로 nested PCR을 시행하여 증폭산물을 확인하였다 (Fig. 2).

결 과

1. Nested PCR의 특이성 및 최저검출농도

장관 내에 존재할 수 있는 총 36종의 균종을 대상으로 nested PCR을 시행하였으며, *C. difficile* ATCC 9689에서만 양성 결과를 보이고 다른 시험 균주 모두에서는 음성 반응을 보였다 (Table 1). B 독소 생성 *C. difficile* ATCC 9689를 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 및 10^3 CFU/mL로 희석하여 nested PCR을 시행한 결과, 10^7 , 10^6 , 10^5 및 10^4 CFU/mL에서는 증폭산물이 관찰되었으나 10^3 CFU/mL에서는 음성 반응을 보였다 (Fig. 2). 따라서 nested PCR에 의한 최저검출농도는 10^4 CFU/mL이었다.

2. Nested PCR의 *C. difficile* B 독소 검출 민감도 및 특이도

C. difficile B 독소 검출이 의뢰된 102개의 변 검체를 대상으로 하였다. CCFA에서 혐기성으로 배양한 결과 31검체에서 *C. difficile*이 증식되었으며, 71검체는 배양 음성이었다. 증식된 31주의 *C. difficile*을 대상으로 PCR로 B 독소 유전자 검출을 시도하였으며, 이 중 29주에서 양성 반응을 보였다. 한편 nested PCR로 변 검체에서 *C. difficile* B 독소의 직접 검출을 시도하였는데, 52검체에서

양성반응을 보였고, 50검체는 음성이었다. CCFA에서 *C. difficile*이 증식되고 PCR로 B 독소가 검출된 29검체 모두는 nested PCR에 의한 직접 검출법에서도 양성반응을 보였으며, CCFA에서 *C. difficile*이 증식되었으나 B 독소가 검출되지 않은 2검체는 nested PCR에 의한 직접 검출법에서 음성반응을 보였다. CCFA를 이용한 배양에서 *C. difficile*이 검출되지 않은 71검체 중 48검체는 nested PCR에 의한 직접 검출법에서도 음성반응을 보였지만, 23검체는 양성반응을 보여 결과가 일치하지 않았다 (Table 3). 따라서 이 등[7]의 방법에 대한 nested PCR의 *C. difficile* B 독소 검출 민감도는 100% (29/29)였으며, 특이도는 68% (50/73)이었다.

고 찰

저자들이 개발한 nested PCR은 장내에 존재하는 다른 균종에서는 음성반응을 보이고 B 독소를 생성하는 *C. difficile*에서만 양성반응을 보였으므로 시발체의 고안이 적절한 것으로 판단된다. 이 등[7]의 방법에 대한 nested PCR의 *C. difficile* B 독소 검출 민감도는 100% (29/29)로 좋은 성적을 보였다. 그러나 nested PCR의 B 독소 생성 *C. difficile* 최소검출 농도가 10^4 CFU/mL로 CCFA 배양법과 이론적으로 유사함에도 불구하고 특이도는 68% (50/73)로 낮았다. 이는 nested PCR의 위양성 결과에 의해서 초래된 것일 수도 있지만 CCFA 배양법의 위음성 결과가 원인일 가능성도 배제할 수 없다.

CCFA에서는 *C. difficile* 외에도 yeast, 그람음성간균 등이 증식될 수 있으므로, 다른 균종이 다량 증식된 경우 *C. difficile*의 검출 민감도가 낮아질 가능성이 있다. 또한 장

Table 4. Sequential results of nested PCR assay for toxin B gene of *C. difficile* and culture in two patients

Patient/Date	Culture	Culture based	Direct detection for toxin B gene
Patient A	(Cell count)	PCR*	in stool specimens by nested PCR
2001. 10. 22	Positive ($>1 \times 10^6$ CFU/g)	Positive	Positive
2001. 10. 25	Negative	ND	Positive
2001. 10. 31	Negative	ND	Positive
2001. 11. 05	Negative	ND	Positive
2001. 11. 09	Negative	ND	Positive
Patient B			
2001. 10. 22	Positive (5×10^6 CFU/g)	Positive	Positive
2001. 11. 08	Negative	ND	Positive
2001. 11. 19	Negative	ND	Negative
2001. 12. 17	Positive ($>1 \times 10^6$ CFU/g)	Positive	Positive

* Results for the detection of toxin B gene in *C. difficile* isolates.

Abbreviation: ND; Not done.

염의 치료를 위해서 metronidazole이나 vancomycin을 경구 투여한 경우 이들 항균제에 의해서 *C. difficile*의 증식이 억제될 수도 있다. 이에 비해서 nested PCR은 다른 균종이나 항균제의 농도에 상관없이 B 독소 유전자를 검출하므로 실질적인 최소검출농도가 배양법보다 높을 수 있다.

연구 기간 중 반복해서 독소생성 *C. difficile*의 검출이 의뢰된 환자의 검사 결과는 위의 가설을 뒷받침한다. A 환자의 경우 2001년 10월 22일 배양검사와 nested PCR 모두에서 B 독소 유전자 양성인 *C. difficile*이 검출되었다. 경구로 metronidazole을 투여하였지만 설사 증상이 지속되어서 이 후 4회에 걸쳐서 추적검사가 의뢰되었다. 추적 검사에서 배양법에서는 *C. difficile*이 검출되지 않았지만 nested PCR에서는 모두 양성반응을 보였다 (Table 4). 이 환자의 경우 metronidazole 투여 후에도 장내에 독소생성 *C. difficile*이 계속 잔류하고 있었던 것으로 추측된다.

B 환자 역시 2001년 10월 22일 배양검사와 nested PCR 모두에서 B 독소 유전자 양성인 *C. difficile*이 검출되었다. Metronidazole 경구 투여에도 설사 증상이 지속되어서 시행한 11월 8일의 추적검사에서는 배양법은 음성, nested PCR은 양성반응을 보였으며, 11월 19일 추적검사에서는 두 방법 모두 음성반응을 보였다. 그러나 metronidazole 투여를 중지한 후 시행한 12월 17일의 추적검사에서는 두 방법 모두 양성반응을 보였다 (Table 4). 이 환자의 경우 역시 metronidazole 투여 후에도 장내에 독소생성 *C. difficile*이 잔류하였던 것으로 추측되며, 11월 19일 검체는 세균의 농도가 매우 낮아서 nested PCR에서도 검출이 되지 않았던 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 nested PCR은 B 독소 유전자 양성 *C. difficile*의 검출에 민감도가 높은 검사법임을 확인할 수 있었다. 또한 metronidazole 투여 후에도 *C. difficile*의 B 독소 유전자를 검출할 수 있기에 항생제 연관 설사증이나 위막성 대장염의 추적검사에도 사용할 수 있는 것으로 생각되었다.

요 약

배 경 : *Clostridium difficile*은 항생제 연관 설사 및 위막성 대장염의 주요 원인균이다. 본 연구에서는 이중중합효소연쇄반응 (nested PCR)을 이용한 검체로부터의 *C. difficile* B 독소 유전자 직접 검출법을 고안하고 그 유용성을 검토하고자 하였다.

방 법 : 장관내에 존재할 수 있는 36종의 균종을 대상으로 고안한 시발체의 특이성을 시험하였으며, B 독소 생성 *C. difficile* ATCC 9689를 10배수 단계 희석하여 nested PCR의 B 독소 유전자 최저검출농도를 측정하였다. 102개의 임상 변 검체를 대상으로 CCFA에서 배양 후 증식된 집락에서 PCR로 B 독소 유전자를 검출한 결과와 변 검체에서 nested PCR로 B 독소 유전자를 직접 검출한 결과를 비교하였다.

결 과 : 저자들이 고안한 nested PCR법은 B 독소 생성 *C. difficile* ATCC 9689에서만 양성 결과를 보이고 다른 시험균주 모두에서는 음성반응을 보였다. Nested PCR에 의한 B 독소 유전자 최저검출농도는 104 CFU/mL이었다. 배양법에 대한 nested PCR의 *C. difficile* B 독소 검출 민감도는 100% (29/29)였으며, 특이도는 68% (50/73)이었다.

결 론 : Nested PCR은 B 독소 유전자 양성 *C. difficile*의 검출에 민감도가 높으며, 항균제 투여 후에도 *C. difficile*의 B 독소 유전자를 검출할 수 있기에 항생제 연관 설사증이나 위막성 대장염의 초기 진단 뿐 아니라 추적검사에도 사용할 수 있을 것으로 생각되었다.

참고문헌

- Borriello SP. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 1998;41(Suppl C):13-9.
- Kato H, Kato N, Watanabe K, Iwai N, Nakamura H, Yamamoto T, et al. Identification of toxin A-negative, toxin

- B-positive Clostridium difficile* by PCR. *J Clin Microbiol* 1998;36:2178-82.
3. Bliss DZ, Johnson S, Savik K, Clabots CR, Gerding DN. Acquisition of *Clostridium difficile* and *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients receiving tube feeding. *Ann Intern Med* 1998;129:1012-9.
 4. Cohen SH, Tang YJ, Silva J, Jr. Molecular typing methods for the epidemiological identification of *Clostridium difficile* strains. *Expert Rev Mol Diagn* 2001;1:61-70.
 5. Castagliuolo I and LaMont JT. Pathophysiology, diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infection. *Keio J Med* 1999;48:169-74.
 6. Johnson S and Gerding DN. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Inf Dis* 1998;26:1027-36.
 7. Nardone DA. Diagnosis of *Clostridium difficile* colitis. *Annals Internal Medicine* 1996;125:515-6.
 8. 이혁민, 김영아, 박광일, 이경원, 정운섭. *Clostridium difficile* 분리주에서의 중합효소 연쇄반응법을 이용한 B 독소 유전자의 검출. *대한임상미생물학회지* 1999;2:77-81.
 9. Groschel DHM. *Clostridium difficile* infection. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996;33:203-45.
 10. Hundsberger T, Braun V, Weidmann M, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C. Transcription analysis of the genes *tcdA-E* of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. *Eur J Biochem* 1997;244:735-42.
 11. Kato N. Points of view on molecular detection and identification of anaerobic bacteria. *Rinsho Biseibutshu Jinsoke Shindan Kenkyukai Shi* 2001;12:51-3.
 12. Guilbault C, Labbe A-C, Poirier L, Busque L, Beliveau C, Laverdiere M. Development and evaluation of a PCR method for detection of the *Clostridium difficile* toxin B gene in stool specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40:2288-90.
 13. Lindqvist R. Preparation of PCR samples from food by a rapid and simple centrifugation technique evaluated by detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol*. 1997 ;37:73-82.
 14. Gumerlock PH, Tang YJ, Weiss JB, Silvia J, Jr. Specific detection of toxigenic strains of *Clostridium difficile* in stool specimens. *J Clin Microbiol* 1993;31:507-11.
 15. Wang R-F, Cao W-W, Cerniglia CE. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:1242-7.